



⑲ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 101 12 825 A 1**

⑤① Int. Cl. 7:  
**A 61 K 47/48**

⑦① Aktenzeichen: 101 12 825.8  
⑦② Anmeldetag: 16. 3. 2001  
⑦③ Offenlegungstag: 2. 10. 2002

DE 101 12 825 A 1

⑦① Anmelder:  
Fresenius Kabi Deutschland GmbH, 61169  
Friedberg, DE

⑦④ Vertreter:  
Uexküll & Stolberg, 22607 Hamburg

⑦② Erfinder:  
Sommermeyer, Klaus, Dr., 61191 Rosbach, DE;  
Eichner, Wolfram, Dr., 35510 Butzbach, DE; Frie,  
Sven, 61169 Friedberg, DE; Lutterbeck, Katharina,  
61169 Friedberg, DE

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ HESylierung von Wirkstoffen in wässriger Lösung

⑤⑦ Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung eines kovalenten HES-Wirkstoff-Konjugates, bei denen man HES und einen Wirkstoff in einem Reaktionsmedium miteinander umsetzt, dadurch gekennzeichnet, dass das Reaktionsmedium Wasser oder ein Gemisch von Wasser mit organischem Lösungsmittel, welches mindestens 10 Gew.-% Wasser umfasst, ist.

Die Erfindung betrifft ferner die HES-Wirkstoff-Konjugate, die nach diesen Verfahren herstellbar sind, sowie Verfahren zur Herstellung von Arznei- und Diagnosemitteln, die entsprechende Verfahren zur Herstellung eines HES-Wirkstoff-Konjugates umfassen.

DE 101 12 825 A 1

- 5 [0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Modifizierung von Wirkstoffen mit Hydroxyethylstärke (HES), bei denen eine kovalente Bindung der Hydroxyethylstärke an die Wirkstoffe in wässriger Lösung erfolgt. Die Erfindung betrifft ferner die HES-Wirkstoff-Konjugate die nach diesen Verfahren herstellbar sind, sowie Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln, die entsprechende Verfahren zur Herstellung eines HES-Wirkstoff-Konjugates umfassen.

## TECHNISCHER HINTERGRUND

- 10 [0002] Der klinische Einsatz vieler Pharma-Wirkstoffe wird durch eine Reihe von Problemen beeinträchtigt (vgl. Delgado et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, Vol. 9 (3, 4), (1992) S. 249–304). Parenteral verabreichte native Proteine unterliegen beispielsweise der Ausscheidung durch das retikuloendotheliale System, die Leber, die Niere und die Milz. Die Ausscheidung erfolgt dabei in Abhängigkeit der Ladung der Kohlenhydratketten, der Präsenz zellulärer Rezeptoren für das Protein und von der Molekülform und -größe. Die Ausschlussgrenze der Glomerularfiltration der Niere liegt beispielsweise bei etwa 67 kD.
- [0003] Als Folge proteolytischer Degradation ist ferner ein schneller Verlust der biologischen Aktivität zu beobachten.
- [0004] Bakteriell exprimierte Proteine sowie andere rekombinante Proteine können eine erhöhte Immunogenität aufweisen und lebensbedrohliche Hypersensitivitätsreaktionen provozieren. Entsprechende Reaktionen verhindern natürlich die medizinische Verwendung dieser Produkte.
- 20 [0005] Aus diesem Grund wurde im Stand der Technik bereits seit Ende der 70er Jahre systematisch an der Verbesserung der Eigenschaften exogener Proteine durch chemische Modifikation, insbesondere Polymerisation oder Kopplung an makromolekulare Polymere geforscht. Viele Arbeiten konzentrierten sich dabei auf die Herstellung von Konjugaten aus Proteinen oder anderen Wirkstoffen einerseits und Polyethylenglykol (PEG) andererseits (vgl. US 4,179,337). Die Vorteile, die man sich von diesen Kopplungsreaktionen erhoffte, umfassen verbesserte in vivo Halbwertszeit der Proteine, verringerte Toxizität, verbesserte Stabilität und verbesserte Löslichkeit der Wirkstoffe (Abuchowski und Davis, *Enzymes as drugs*, Holcenberg und Rubberts, Herausgeber, S. 367–383, John Wiley & Sons N. Y. (1981).
- [0006] Das Verfahren zur Kopplung der Wirkstoffe erwies sich jedoch als problematisch, da die aktive Gruppe des Proteins durch Kopplung an PEG inaktiviert wurde oder die Reaktionen das Reaktionsprodukt nicht in brauchbarer Ausbeute lieferten. Um eine spezifische Bindung zu erzielen, die die Aktivität des Wirkstoffs nicht beeinträchtigt, wurden
- 30 aktive Gruppen in PEG oder den Wirkstoff eingeführt oder die Verbindungen mit einem Linker aneinander gebunden. Üblicherweise wird PEG dafür mit einer aktiven Gruppe versehen, welche nachfolgend kovalent an die kopplungsfähige Gruppe eines Proteins gebunden wird.
- [0007] So wurde beispielsweise der Verlust der Bindungsaktivität von Antikörpern und deren Fragmenten nach deren Kopplung an PEG beschrieben (Kitamura et al., *Cancer Res.*, Vol. 51 (1991), S. 4310–4315; und Pedley, et al., *Br. J. Cancer*, Vol. 79 (1994), S. 1126–1130). Zur Lösung dieses Problems schlagen Chapman et al. (*Nature Biotech.*, Vol. 17 (1999), S. 780–783) vor, PEG an bestimmte Bindungsstellen des Antikörpers zu binden.
- [0008] Der Aktivitätsverlustes des Kopplungspartners wird ferner in WO 95/13090 beschrieben. Zur Lösung wird vorgeschlagen, PEG mit einer reaktiven Gruppe zu aktivieren und PEG über diese reaktive Gruppe in Gegenwart eines Tensides an  $\alpha$ -Interferon zu binden. Als bevorzugte reaktive Gruppe wird N-Succinimid-Carbonat genannt, das unter den genannten Bedingungen mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysin eine Urethan-Bindung ausbilden soll.
- 40 [0009] Auch die WO 96/41813 offenbart Verfahren zur Herstellung eines Polymer-Polypeptid-Konjugates, bei denen das Polymer (insbesondere PEG) an einer spezifischen Stelle derivatisiert und anschließend an ein Polypeptid gebunden wird. Vorzugsweise wird dabei eine Amino-Oxi-Acetyl-Gruppe in PEG eingebracht und diese Verbindung anschließend an ein Polypeptid, insbesondere an IL-8, hG-CSF und IL-1 gebunden.
- 45 [0010] In der Literatur finden sich somit eine Vielzahl von Beispielen für entsprechende Konjugate; vgl. PEG-Insulin-Konjugate in US 4,179,337, PEG-bovines-Hämoglobin-Konjugate in US 4,412,989, PEG-Ribonuklease-Konjugate und PEG-Superoxiddismutase-Konjugate in Veronese et al., *Applied Biochem. Biotech.*, Vol. 11, 141–152 (1995), PEG-IL-2-Konjugate oder PEG-IFN- $\beta$ -Konjugate in US 4,766,106, PEG-Polymyxin-Konjugate in WO 90/15628 und PEG-IL-2-Konjugate in WO 90/07939. Einige Konjugate befinden sich inzwischen in der klinischen Anwendung. Beispielsweise konnten die Eigenschaften des Enzyms Asparaginase durch Konjugatbildung mit PEG verbessert werden, und ein PEG-Asparaginase-Konjugat ist unter der Marke Oncaspar® für die Krebstherapie kommerziell erhältlich. Eine große Anzahl weiterer Produkte befindet sich in den verschiedenen Phasen der klinischen Entwicklung (vgl. PEG-Pipeline unter [www.enzon.com](http://www.enzon.com)).
- 50 [0011] Nicht nur Proteine sondern auch andere Verbindungen wurden nach diesem Schema an PEG und andere Polymere gekoppelt. WO 97/33552 und WO 97/38727 offenbaren beispielsweise die Kopplung von Paclitaxel an PEG und die Verwendung des Konjugates zur Behandlung von Tumoren. Die Verwendung eines PEG-Camptothecin-Konjugates zur Behandlung von Tumoren wird von der Firma Enzon in der klinischen Phase I untersucht.
- [0012] Ferner sind auch Kopplungsreaktionen mit drei Verbindungen durchgeführt worden. WO 93/23062 offenbart beispielsweise die Herstellung eines Kopplungsproduktes aus einem gegen ein B-Zell-Lymphom gerichteten Antikörper, aktiviertem PEG und einem Toxin.
- 60 [0013] PEG-Protein-Konjugate weisen jedoch keine natürliche Struktur auf, für die in vivo Abbauege beschrieben wurden. Unter anderem aus diesem Grund sind neben den PEG-Konjugaten auch andere Konjugate und Protein-Polymerisate für die Lösung der oben genannten Probleme erzeugt worden. So gibt es eine Vielzahl von Verfahren zur Vernetzung verschiedener Proteine und Bindung von Proteinen an Makromoleküle (vgl. zusammenfassende Darstellung in
- 65 Wong, S. S., "Chemistry of protein conjugation and cross linking", CRCs, Inc. (1993)).
- [0014] HES wird als Derivat eines natürlich vorkommenden Amylopektins im Körper durch  $\alpha$ -Amylase abgebaut. Auch die Herstellung von HES-Protein-Konjugaten ist bereits im Stand der Technik beschrieben worden (vgl. HES-Hämoglobin-Konjugate in DE 26 16 086 oder DE 26 46 854).

- [0015] Hämoglobin ist ein Protein, das als Blutersatz- und Sauerstofftransport-Mittel (sog. "Hämoglobin-Based-Oxygen Carrier", HBOC) eine große klinische Bedeutung haben könnte. Obgleich der Bedarf an einem derartigen Produkt jedoch bereits frühzeitig erkannt wurde (vgl. Rabiner, J. Exp. Med. 126, (1967) 1127), hat bisher keines der bekannten HBOC-Produkte den Status eines zugelassenen Arzneimittels erreicht.
- [0016] Das natürliche Hämoglobin besteht aus zwei  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peptidketten, die als prosthetische Gruppe jeweils ein Häm gebunden haben. Isolierte Hämoglobin-Moleküle sind jedoch sehr instabil und zerfallen rasch in die stabileren  $\alpha_2\beta_2$ -Dimere (MG 32 kDa). Die biologische Halbwertszeit von isoliertem Hämoglobin im Blutkreislauf liegt bei etwa 1 Stunde, da die Dimere schnell über die Nieren ausgeschieden werden. Dabei erzeugen die Dimere nephrotoxische Nebenwirkungen (vgl. Bunn & Jandl, J. Exp. Med. 129, (1967) 925-934). Entwicklungsarbeiten an derivatisierten Hämoglobin-Molekülen waren daher in erster Linie darauf gerichtet, Hämoglobin intramolekular zu vernetzen, zur Bildung von polymeren HBOC-Formen intermolekular zu verknüpfen und/oder an Polymere zu koppeln.
- [0017] Die bekannten Hämoglobin-Konjugate werden beispielsweise in Xue und Wong (Meth. in Enzymol., 231 (1994), S. 308-322) und in DE 26 16 086 und DE 26 46 854 beschrieben. Letztere offenbart Verfahren mittels derer Hämoglobin an HES gebunden wird, indem HES zunächst mit Natriumperiodat umgesetzt wird. Dabei entstehen Dialdehyde, an die Hämoglobin gebunden wird. Demgegenüber beschreibt die DE 26 16 086 die Kopplung von Hämoglobin an HES nach einem Verfahren, bei dem zunächst ein Vernetzungsmittel (z. B. Bromcyan) an HES gebunden wird und anschließend Hämoglobin an das Zwischenprodukt gebunden wird.
- [0018] HES ist ein substituiertes Derivat des in Maisstärke zu 95% vorkommenden Kohlenhydrat-Polymers Amylopektin. HES weist vorteilhafte rheologische Eigenschaften auf und wird zurzeit als Volumenersatzmittel und zur Hämodilutionstherapie klinisch eingesetzt (Sommermeyer et al., Krankenhauspharmazie, Vol. 8 (8), (1987), S. 271-278; und Weidler et al., Arzneim.-Forschung/Drug Res., 41, (1991) 494-498).
- [0019] Amylopektin besteht aus Glucoseeinheiten, wobei in den Hauptketten  $\alpha$ -1,4-glykosidische Bindungen vorliegen, an den Verzweigungsstellen jedoch  $\alpha$ -1,6-glykosidische Bindungen. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften dieses Moleküls werden im Wesentlichen durch die Art der glykosidischen Bindungen bestimmt. Aufgrund der abgeknickten  $\alpha$ -1,4-glykosidischen Bindung entstehen helikale Strukturen mit etwa 6 Glucose-Monomeren pro Windung.
- [0020] Die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Polymers können durch Substitution verändert werden. Die Einführung einer Hydroxyethylgruppe kann durch alkalische Hydroxyethylierung erreicht werden. Durch die Reaktionsbedingungen kann die unterschiedliche Reaktivität der jeweiligen Hydroxylgruppe im unsubstituierten Glucosemonomer gegenüber der Hydroxyethylierung ausgenutzt werden, dadurch ist eine begrenzte Einflussnahme auf das Substitutionsmuster möglich.
- [0021] Daher wird HES im Wesentlichen über die Molekulargewichtsverteilung und den Substitutionsgrad gekennzeichnet. Der Substitutionsgrad kann dabei als DS ("degree of substitution"), welcher auf den Anteil der substituierten Glucosemonomere aller Glucoseeinheiten Bezug nimmt, oder als MS ("molar substitution") beschrieben werden, womit die Anzahl von Hydroxyethylgruppen pro Glucoseeinheit bezeichnet wird.
- [0022] HES-Lösungen liegen als polydisperse Zusammensetzungen vor, in denen sich die einzelnen Moleküle hinsichtlich des Polymerisationsgrades, der Anzahl und Anordnung der Verzweigungsstellen, sowie ihres Substitutionsmusters voneinander unterscheiden. HES ist somit ein Gemisch von Verbindungen mit unterschiedlichem Molekulargewicht. Dementsprechend wird eine bestimmte HES-Lösung durch ein durchschnittliches Molekulargewicht anhand statistischer Größen bestimmt. Dabei wird  $M_n$  als einfaches arithmetisches Mittel in Abhängigkeit von der Anzahl der Moleküle errechnet (Zahlenmittel), während  $M_w$ , das Gewichtsmittel, die masseabhängige Messgröße darstellt.
- [0023] Eine selektive chemische Bindung von Proteinen an HES wurde bisher jedoch dadurch verhindert, dass die Aktivierung der HES nicht selektiv erfolgt. So resultieren die im Stand der Technik bekannten Protein-HES-Konjugate aus einer nicht-selektiven Kopplung von Bromcyan-aktivierter HES an Hämoglobin (vgl. DE 26 16 086). Entsprechende Verfahren können zu polydispersen Produkten mit uneinheitlichen Eigenschaften und potentiell toxischen Nebenwirkungen führen.
- [0024] Von Hashimoto (Hashimoto et al., Kunststoffe, Kautschuk, Fasern, Vol. 9, (1992) S. 1271-1279) wurde erstmals ein Verfahren offenbart, in dem eine reduzierende Aldehyd-Endgruppe eines Saccharids selektiv oxidiert werden konnte, wobei ein reaktiver Ester (Lacton) gewonnen wurde.
- [0025] Auf der Grundlage dieses Verfahrens offenbart WO 98/01158, dass Hämoglobin-Hydroxyethylstärke-Konjugate erhalten werden können, in denen Hämoglobin an HES selektiv über Amidbindungen zwischen freien Aminogruppen des Hämoglobins und der in oxidierte Form vorliegenden reduzierenden Endgruppe der HES miteinander verknüpft sind. Sowohl die in Hashimoto et al. offenbarten Verfahren als auch die Verfahren gemäß WO 98/01158 basieren jedoch auf einer Reaktion zwischen Saccharid (HES) und Protein (Hämoglobin) in organischem Lösungsmittel. Konkret wurde in dieser Veröffentlichung Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet.
- [0026] Dem Fachmann ist jedoch bekannt, dass viele Proteine in organischen Lösungsmitteln eine Strukturänderung erleiden, welche sich in wässrigen Lösungen nicht zurückbildet. In der Regel geht mit der Strukturänderung auch ein Aktivitätsverlust einher. In jedem Fall ist das organische Lösungsmittel aufwendig zu entfernen, da für die geplante medizinische Verwendung bereits residuale Anteile organischer Lösungsmittel nicht akzeptabel sein können. Sogar die potentielle Gefahr von Verunreinigungen und Strukturänderungen der Proteine ist im Hinblick auf die geplante Verwendung auszuschließen.
- [0027] Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, verbesserte Verfahren zur Herstellung von Hydroxyethylstärke-Wirkstoff-Konjugaten zur Verfügung zu stellen, die zu biologisch aktiven Konjugaten führen, welche im klinischen Alltag eingesetzt werden können. Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein Verfahren zur Herstellung von Hydroxyethylstärke-Wirkstoff-Konjugaten bereit zu stellen, bei denen nicht in nennenswertem Umfang Nebenprodukte erzeugt werden, da auch diese Nebenprodukte die anschließende Aufreinigung des Produktes in erheblichem Umfang beeinträchtigen.
- [0028] Diese Aufgabe wurde nunmehr überraschenderweise durch Verfahren zur Herstellung eines kovalenten HES-Wirkstoff-Konjugates gelöst, bei dem man HES und mindestens einen Wirkstoff in einem wässrigen Reaktionsmedium

miteinander umgesetzt und ist dadurch gekennzeichnet, dass das Reaktionsmedium Wasser oder ein Gemisch von Wasser mit organischem Lösungsmittel, welches mindestens 10 Gew.-% Wasser umfaßt, ist.

[0029] Vorzugsweise wird HES vor Bindung an den Wirkstoff oxidiert, wobei eine spezifische Oxidation der reduzierenden Endgruppen besonders bevorzugt ist. Alternativ dazu kann die Kopplung über die Bildung einer Schiff'schen Base zwischen HES und einem Amin Gruppen-tragenden Wirkstoff als Zwischenprodukt erfolgen. Dieses Zwischenprodukt wird anschließend unter Ausbildung einer Methylenaminingruppe reduziert.

[0030] Schließlich werden durch die vorliegende Erfindung HES-Wirkstoff Konjugate zur Verfügung gestellt, die durch die obigen Verfahren erhältlich sind.

10

## KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0031] Fig. 1 GPC Chromatogramm der Kopplungsreaktion zwischen ox-HES 130 kD und HSA nach Verfahren A. III;

[0032] Fig. 2 GPC Chromatogramm der Kopplungsreaktion zwischen ox-HES 130 kD und HSA nach Verfahren A. IV;

[0033] Fig. 3 GPC Chromatogramm der Kopplungsreaktion zwischen ox-HES 130 kD und HSA nach Verfahren A. V und einer Reaktionszeit von 2 Stunden;

[0034] Fig. 4 GPC Chromatogramm der Kopplungsreaktion zwischen ox-HES 130 kD und HSA, Verfahren A. V, Reaktionszeit über Nacht;

[0035] Fig. 5 GPC Chromatogramm der Kopplungsreaktion zwischen ox-HES 10 kD und HSA nach Verfahren A. V nach 2 Stunden (Fig. 5a) und über Nacht (Fig. 5b);

[0036] Fig. 6 GPC Chromatogramm der Kopplungsreaktion zwischen ox-HES 130 kD und HSA nach Verfahren A. VII, nach 24 Stunden Reaktionszeit;

[0037] Fig. 7 GPC Chromatogramm der Kopplungsreaktion zwischen ox-HES 130 kD und HSA nach Verfahren B. V;

[0038] Fig. 8 SDS-PAGE und Western Blot verschiedener Kopplungsreaktionen zwischen HES und HSA;

[0039] Fig. 9 SDS-PAGE und Western Blot verschiedener Kopplungsreaktionen zwischen HES und HSA;

[0040] Die vorliegende Erfindung stellt erstmals ein Verfahren zur Herstellung eines kovalenten HES-Wirkstoff-Konjugates zur Verfügung, bei dem man HES und mindestens einen Wirkstoff in einem wässrigen Reaktionsmedium miteinander umsetzt und ist dadurch gekennzeichnet, dass das Reaktionsmedium Wasser oder ein Gemisch von Wasser mit organischem Lösungsmittel, welches mindestens 10 Gew.-% Wasser umfaßt, ist.

[0041] Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird eine chemische Verbindung als Wirkstoff bezeichnet, wenn die Verbindung geeignet ist, aktiver Bestandteil eines beliebigen Mittels für therapeutische oder diagnostische Zwecke zu sein. Eine Übersicht über die zugelassenen Arzneimittel und deren Wirkstoffe befindet sich in der Roten Liste. Alle in der Roten Liste genannten Wirkstoffe können für die Herstellung der HES-Wirkstoff-Konjugate nach dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden. Dafür kann es notwendig sein, eine aktive Gruppe, beispielsweise mittels Linker, in den Wirkstoff vor der Bindung an HES einzuführen. Gemäß der vorliegenden Erfindung umfaßt der Begriff Wirkstoff aber auch alle Verbindungen, deren Eignung für die diagnostische oder therapeutische Verwendung zwar bekannt ist, die jedoch aufgrund der oben dargestellten Probleme bisher für diesen Zweck nicht eingesetzt werden konnten. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Wirkstoff um ein Vitamin, Impfstoff, Toxin, Antibiotikum, Appetitzügler, Anästhetikum, Analgetikum, Antirheumatikum, Antiallergikum, Asthmastatikum, Antidepressivum, Antidiabetikum, Antihistaminikum, Antihypertonikum, oder ein antineoplastisches Mittel. Strukturell kann es sich beispielsweise um ein Hormon, Steroid, Lipid, Protein, Oligo- oder Polypeptid oder um eine Nukleinsäure handeln.

[0042] Die nach der vorliegenden Erfindung hergestellten Verbindungen behalten die Aktivität des Wirkstoffes und die vorteilhaften Eigenschaften der HES. Als weitere Vorteile weisen die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Konjugate eine verbesserte in vivo Halbwertszeit der Wirkstoffe, verringerte Toxizität, verbesserte Stabilität und verbesserte Löslichkeit der Wirkstoffe auf.

[0043] Das Reaktionsmedium des erfindungsgemäßen Verfahrens umfaßt mindestens 10 Gew.-%, bevorzugt mindestens 50 Gew.-%, insbesondere mindestens 80 Gew.-%, wie beispielsweise 90 Gew.-%, oder sogar bis zu 100 Gew.-%, Wasser, und dementsprechend höchstens 90% Gew.-%, bevorzugt höchstens 50% Gew.-%, insbesondere höchstens 20 Gew.-%, beispielsweise 10 Gew.-%, oder sogar bis zu 0 Gew.-%, organisches Lösungsmittel. Die Reaktion findet also in einer wässrigen Phase statt. Das bevorzugte Reaktionsmedium ist Wasser.

[0044] Das erfindungsgemäße Verfahren ist schon deshalb von Vorteil, weil nicht zwangsläufig toxikologisch bedenkliches Lösungsmittel eingesetzt werden muss und demzufolge bei dem erfindungsgemäß hergestellten Produkt die Entfernung, auch geringer Reste toxikologisch bedenklicher Lösungsmittel entfällt, wie sie nach dem bekannten Verfahren immer zwingend ist, um die unerwünschte Verunreinigung mit Lösungsmittel zu vermeiden. Weiterhin kann die nach dem bisherigen Verfahren notwendige zusätzliche Qualitätskontrolle auf Reste toxikologisch bedenklicher Lösungsmittel unterbleiben, weil das erfindungsgemäße Verfahren die Verwendung von toxikologisch nicht bedenklichen Lösungsmitteln bevorzugt. Erfindungsgemäß bevorzugte Lösungsmittel sind beispielsweise toxikologisch unbedenkliche protische Lösungsmittel wie Ethanol oder Propylenglykol.

[0045] Weiterhin ist ein Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens, dass durch organische Lösungsmittel induzierte irreversible oder reversible Strukturänderungen von Proteinen oder Peptiden grundsätzlich vermieden werden, die bei Verfahren in organischen Lösungsmitteln nicht systematisch ausgeschlossen werden können. Das nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltene Produkt ist demzufolge von dem in DMSO hergestellten verschieden.

[0046] Erfindungsgemäß wurde ferner überraschenderweise festgestellt, dass eine Kopplung von HES an Wirkstoffe in einer wässrigen Lösung vorgenommen werden kann, ohne dass dabei in nennenswertem Umfang Nebenreaktionen zu beobachten sind. Das erfindungsgemäße Verfahren führt somit unmittelbar zu verbesserten Produkten in großer Reinheit. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht somit erstmals die einfache Herstellung von HES-Wirkstoff-Konjugaten, in denen der Wirkstoff in aktiver Form vorliegt und die vorteilhaften Eigenschaften der HES erhalten bleiben. Zur Isolierung des HES-Wirkstoff-Konjugates aus dem Reaktionsgemisch sind keine besonderen Verfahren erforderlich, da die Reaktion in der wässrigen Phase erfolgt, also nicht zwangsläufig organische Lösungsmittel abgereinigt werden müssen.

- [0047] Erfindungsgemäß ist es bevorzugt, dass HES unmittelbar an eine  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-Gruppe,  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-Gruppe, SH-Gruppe, COOH-Gruppe oder -C(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-Gruppe des Wirkstoffes bindet. Alternativ dazu kann eine weitere reaktive Gruppe in HES eingeführt werden oder die Bindung zwischen HES und dem Wirkstoff über einen Linker erfolgen. Die Verwendung von entsprechenden Linkern zur Bindung von Wirkstoffen an PEG ist im Stand der Technik bekannt. Die Verwendung von Aminosäuren, insbesondere Glycin, Alanin, Leucin, Isoleucin, und Phenylalanin, sowie von Hydrazin- und Oxylamin-Derivaten als Linker, wie in WO 97/38727 und EP 605 963 offenbart ist bevorzugt. 5
- [0048] Gemäß einer Ausführungsform des Verfahrens der vorliegenden Erfindung wird HES vor Bindung an den Wirkstoff oxidiert. Die Oxidation kann nach einem der im Stand der Technik bekannten Verfahren erfolgen, wobei eine selektive Oxidation der reduzierenden Endgruppen der HES bevorzugt ist. Dies ermöglicht Verfahren, bei denen die oxidierte reduzierende Endgruppe der HES mit einer Aminogruppe des Wirkstoffes unter Ausbildung eines Amids reagiert. 10 Diese Ausführungsform weist den besonderen Vorteil auf, dass eine spezifische Bindung zwischen HES und den Wirkstoffen und somit ein besonders homogenes Produkt erzielt wird.
- [0049] Dabei läßt man HES mit oxidierten reduzierenden Endgruppen und den Wirkstoff vorzugsweise mindestens 12, besonders bevorzugt mindestens 24 Stunden miteinander reagieren. Ferner kann es wünschenswert sein, einen beliebigen Aktivator, beispielsweise Ethyldimethyl-aminopropyl-Carbodiimid (EDC), zuzugeben. Das Mol-Verhältnis zwischen HES und Wirkstoff während der Reaktion kann beliebig gewählt werden, liegt üblicherweise im Bereich von HES : Wirkstoff von 20 : 1 bis 1 : 20, wobei ein Verhältnis von 6 : 1 bis 1 : 6 besonders bevorzugt ist. Die besten Ergebnisse wurden bei einem Mol-Verhältnis von HES : Wirkstoff von etwa 2 : 1 erzielt. 15
- [0050] Andere Kopplungsreaktionen zwischen einer Aminogruppe des Wirkstoffes und HES sind selbstverständlich auch vom Umfang der Erfindung umfaßt. Beispielsweise Verfahren, bei denen HES und der Wirkstoff unmittelbar miteinander umgesetzt werden, wobei eine Schiff'sche zwischen HES und Wirkstoff als Zwischenprodukt entsteht. Die Azomethingruppe -CH=N- der Schiff'schen Base kann anschließend unter formaler Addition von <2H> zu einer Methylenamino-Gruppe -CH<sub>2</sub>-NH- reduziert werden. Für diese Reduktion kann der Fachmann eine Vielzahl von im Stand der Technik bekannten Reduktionsmitteln verwenden, wobei die Reduktion mittels BH<sub>4</sub> besonders bevorzugt ist. 20
- [0051] Die Kopplung des HES kann an eine beliebige Gruppe des Wirkstoffes erfolgen. Die Kopplung wird vorzugsweise so vorgenommen, dass das Konjugat mindestens 50%, vorzugsweise mindestens 75% der Aktivität des Wirkstoffes vor der Kopplung aufweist, wobei ein Erhalt von mindestens 95% der Aktivität besonders bevorzugt ist. Die Kopplungsreaktion kann natürlich auch so gesteuert werden, dass die Bindung des HES ausschließlich an eine oder mehrere bestimmte Gruppen des Wirkstoffes erfolgt, beispielsweise an Lysin- oder oder Cystein-Reste eines Peptids. Besondere Vorteile ergeben sich, wenn man HES über die oxidierten reduzierenden Endgruppen an eine oder mehrere bestimmte Gruppen des Wirkstoffes bindet, da bei einem entsprechenden Vorgehen homogene HES-Wirkstoff-Konjugate erhalten werden. 25
- [0052] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens der vorliegenden Erfindung werden als Ausgangsstoffe für die Reaktion HES und ein Protein oder ein Peptid eingesetzt. Dabei können beliebige therapeutische oder diagnostische Proteine natürlichen oder rekombinante Ursprungs verwendet werden. Eine Liste der derzeit auf dem Markt befindlichen Wirkstoffe rekombinanter Herstellung findet sich in Pharma Buisness, July/August 2000, Seiten 45 bis 60. Die vorliegende Erfindung umfaßt die Herstellung von HES-Wirkstoff-Konjugaten, die irgend einen der in dieser Veröffentlichung genannten Wirkstoffe umfassen. 30
- [0053] Die Herstellung von Konjugaten unter Verwendung von Zytokinen, beispielsweise Interferonen, Interleukinen, Wachstumsfaktoren, Enzymen, Enzym-Inhibitoren, Rezeptoren, Rezeptor-Fragmenten, Insulin, Faktor VIII, Faktor IX, Peptid-Antibiotika, virale Hüll-Proteine, Hämoglobin, Erythropoietin, Albumin, hTPA, Antikörper, Antikörperfragmenten, Einzelketten-Antikörper, DNA, RNA oder ein Derivat davon ist besonders bevorzugt. Besondere Vorteile ergeben sich bei der Verwendung von rekombinanten Proteinen oder Peptiden in dem erfindungsgemäßen Verfahren. Wie bereits ausgeführt, können entsprechende Proteine häufig aufgrund ihrer für Menschen antigenen Eigenschaften nicht als Wirkstoffe eingesetzt werden. Nach Kopplung an HES durch die erfindungsgemäßen Verfahren verringert sich jedoch die Immunogenität der rekombinanten Proteine, was den medizinische Einsatz am Menschen ermöglicht. 35
- [0054] Besondere Vorteile ergeben sich ferner bei der Kopplung von HES an kurzkettige Proteine und kleinere Peptide. Derzeit werden eine Vielzahl von Peptidbanken erstellt, beispielsweise Phagen-Display-Banken, bei denen kurze Oligopeptide (beispielsweise 3- bis 20-mer) auf der Oberfläche von Phagen exprimiert werden. Ferner werden Antikörper aus einer einzigen Polypeptidkette (sogenannte "single chain antibodies", Einzelketten-Antikörper) in Bakterien oder auf der Oberfläche von Phagen exprimiert. Diese Banken werden auf bestimmte Wirkstoff- oder Bindungs-Aktivität hin durchgesehen. Die therapeutische und diagnostische Verwendung entsprechender Peptid-Wirkstoffe oder Antikörper scheitert jedoch bislang daran, dass diese im Organismus aufgrund ihrer geringen Größe sehr schnell ausgeschieden werden (vgl. Chapman et al., 1999, a. a. O.). Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren können diese Peptide vorteilhaft an HES gekoppelt werden, und weisen eine in vivo Halbwertszeit auf, die eine Verwendung als Wirkstoff ermöglicht. 40
- [0055] Alternativ zu den obigen Ausführungsformen kann als Wirkstoff ein Hormon, ein Steroidhormon, ein von Aminosäuren abgeleitetes Hormon oder ein von Fettsäuren abgeleitetes Hormon eingesetzt werden. Im Einzelfall mag es notwendig sein, mittels einer aktiven Gruppe, beispielsweise mittels Linker, in das Hormon vor der Bindung an HES einzuführen. 45
- [0056] Erfindungsgemäß kann beliebige physiologisch verträgliche HES als Ausgangsmaterial verwendet werden. HES mit einem mittleren Molekulargewicht (Gewichtsmittel) von 1 bis 300 kDa, insbesondere von 1 bis 150 kDa ist bevorzugt. HES mit einem mittleren Molekulargewicht von 2 bis 40 kD ist besonders bevorzugt. HES weist vorzugsweise einen molaren Substitutionsgrad von 0,1 bis 0,8 und ein Verhältnis von C<sub>2</sub> : C<sub>6</sub>-Substitution im Bereich von 2 bis 20, jeweils bezogen auf die Hydroxyethylgruppen, auf. 50
- [0057] Die Erfindung betrifft ferner die nach den obigen Verfahren erhältlichen HES-Wirkstoff-Konjugate. Diese Konjugate weisen vorteilhafte Eigenschaften auf, nämlich hohe Aktivität des Wirkstoffes, geringe Immunogenität, lange Verweilzeit im Körper und exzellente rheologische Eigenschaften, welche den medizinischen Nutzen der Konjugate steigern. 55 60 65

- [0058] Demgemäß umfaßt die vorliegende Erfindung ebenfalls Verfahren zur Herstellung eines Arznei- oder Diagnosemittels, bei denen man ein HES-Wirkstoff-Konjugat nach einem der obigen Verfahren herstellt und mit einem der im Stand der Technik bekannten, pharmazeutisch verträglichen Träger, Adjuvans oder Hilfsstoff vermischt, sowie nach diesem Verfahren erhältliche Arznei- oder Diagnosemittel.
- 5 [0059] Die medizinische Verwendung des entsprechenden Arzneimittels hängt von der Art des Wirkstoffs ab. Wird beispielsweise Hämoglobin als Wirkstoff eingesetzt, kann das Konjugat als Sauerstoff-Transport-Mittel verwendet werden. Wird andererseits ein Zytokin als Wirkstoff für die Herstellung verwendet, kann das Konjugat beispielsweise in der Tumortherapie verwendet werden. Die Konzentration des jeweils zu verwenden Konjugates in dem Arzneimittel kann von jedem durchschnittlichen Fachmann ohne weiteres in Dosis-Wirkungstests ermittelt werden.
- 10 [0060] Die Diagnosemittel können in vivo oder in vitro zur Diagnose von Erkrankungen oder Störungen verwendet werden. Wenn als Wirkstoff ein Antikörper oder Antikörperfragment eingesetzt wird, eignet sich das Konjugat beispielsweise für die Durchführung der im Stand der Technik üblichen ELISA-Nachweisverfahren.
- [0061] In den Beispielen wurden die nachfolgend beschriebenen Materialien verwendet:  
 Humanes Serumalbumin: Sigma-Aldrich A3782
- 15 HES 130 kD: Typ 130/0,5, hergestellt aus T91SEP (Fresenius Kabi)  
 Daten:  $M_w$ : 130 000  $\pm$  20 000 D  
 $M_n$ : 42 600 D  
 HES 10 kD: Typ HHH 4-2 (Fresenius Kabi)  
 Daten:  $M_w$ : 9 800 D
- 20  $M_n$ : 3 695 D  
 EDC: Sigma-Aldrich Nr. 16.146-2 (Ethyl-dimethyl-aminopropyl-Carbodiimid)  
 HOBt Sigma-Aldrich Nr. 15.726-0 (1-Hydroxy-1H-Benzotriazolhydrat)  
 DIG-Glykandetektkit: Roche-Boehringer Nr. 1142 372
- [0062] Die folgenden Beispiele 1 bis 6 beschreiben die Kopplung von HSA und Diaminobutan an HES mit oxidierten  
 25 reduzierenden Endgruppen oder die direkte Kopplung von HSA an HES. HSA und Diaminobutan sind dabei lediglich Beispiele für die oben definierten Wirkstoffe.

## Beispiel 1

## 30 Selektive Oxidierung der reduzierenden Endgruppen der Hydroxyethylstärke

- [0063] Für die selektive Oxidierung der reduzierenden Endgruppen der Hydroxyethylstärke (130 kD und 10 kD) wurde diese in einer minimalen Menge Wasser aufgelöst und mit einer verschiedenen Mengen einer Iod-Lösung und einer KOH-Lösung versetzt.
- 35 [0064] Die Mischung wurde gerührt, bis die auf  $I_2$  hinweisende Farbe verschwand. Diese Vorgehensweise wurde mehrfach wiederholt, um die Zugabe einer größeren Menge der Iod-Lösung und KOH-Lösung zu erreichen. Die Lösung wurde anschließend über einen Amberlite IR 120  $Na^+$  Kationenaustauscherharz gereinigt, für 20 Stunden gegen destilliertes Wasser dialysiert (Dialyseröhrchen mit einer Ausschlussgrenze von 4–6 kD) und lyophilisiert.
- 40 [0065] Der Grad der Oxidation wurde jeweils mittels des in Somogyi, N. (Method in Carbohydride Chemistry, Vol. 1, (1962) S. 384–386) offenbarten Verfahrens ermittelt. Die Protokolle der Oxidationsreaktion sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

45

50

55

60

65

# DE 101 12 825 A 1

Tabelle 1

Oxidation der reduzierenden Endgruppen der HES (130 kD und 10 kD) unter verschiedenen Bedingungen

Verfahren	HES (Mn)	Iod-Lösg. 0.1N	KOH-Lösg. 0.1N	Lösungs- mittel	Reaktionszeit	Ertrag
OXIDATION (1) HES 130	1 g $2.4 \times 10^{-5}$ mol	0.3 ml $3.0 \times 10^{-5}$ mol	0.5 ml $5.0 \times 10^{-5}$ mol	Wasser 4.0 ml	4 h 25°C	30,1%
OXIDATION (2) HES 130	4 g $9.4 \times 10^{-5}$ mol	1.0 ml $1.0 \times 10^{-4}$ mol	1.5 ml $1.5 \times 10^{-4}$ mol	Wasser 6.0 ml	ü. Nacht 25°C	24,8%
OXIDATION (3) HES 130	5 g $1.2 \times 10^{-4}$ mol	1.2 ml $1.2 \times 10^{-4}$ mol	1.5 ml $1.5 \times 10^{-4}$ mol	Wasser 7.5 ml	ü. Nacht 25°C	24,3%
OXIDATION (4) HES 130	5 g $1.2 \times 10^{-4}$ mol	3.0 ml $3.0 \times 10^{-4}$ mol	4.5 ml $4.5 \times 10^{-4}$ mol	Wasser 7.5 ml	ü. Nacht 25°C	60,8%
OXIDATION (5) HES 130	5 g $1.2 \times 10^{-4}$ mol	4.0 ml $4.0 \times 10^{-4}$ mol	5 ml $5.0 \times 10^{-4}$ mol	Wasser 7.5 ml	ü. Nacht 25°C	80,0%
OXIDATION (6) HES 130	8 g $1.9 \times 10^{-4}$ mol	7.0 ml $7.0 \times 10^{-4}$ mol	11.5 ml $1.2 \times 10^{-3}$ mol	Wasser 7.5 ml	ü. Nacht 25°C	88,4%
OXIDATION (7) HES 130	10 g $2.4 \times 10^{-4}$ mol	10 ml $1.0 \times 10^{-3}$ mol	20 ml $2.0 \times 10^{-3}$ mol	Wasser 7.5 ml	ü. Nacht 25°C	100%
OXIDATION (1) HES 10	5 g $1.4 \times 10^{-3}$ mol	2.0 ml $2.0 \times 10^{-4}$ mol	2.0 ml $2.0 \times 10^{-4}$ mol	Wasser 10.0 ml	20 h 25°C	3,0%
OXIDATION (2) HES 10	5 g $1.4 \times 10^{-3}$ mol	3.5 ml $3.5 \times 10^{-4}$ mol	4.5 ml $4.5 \times 10^{-4}$ mol	Wasser 10.0 ml	ü. Nacht 25°C	5,3%
OXIDATION (3) HES 10	15 g $4.1 \times 10^{-3}$ mol	21.0 ml $2.1 \times 10^{-3}$ mol	31.0 ml $3.1 \times 10^{-3}$ mol	Wasser	ü. Nacht 25°C	10,5%
OXIDATION (4) HES 10	8 g $2.2 \times 10^{-3}$ mol	83.0 ml $8.3 \times 10^{-3}$ mol	180.0 ml $1.8 \times 10^{-2}$ mol	Wasser	ü. Nacht 25°C	80,0%
OXIDATION (5) HES 10	7 g $1.9 \times 10^{-3}$ mol	95.0 ml $9.5 \times 10^{-3}$ mol	210.0 ml $2.1 \times 10^{-2}$ mol	Wasser	ü. Nacht 25°C	100,0%
OXIDATION (6) HES 10	6,4 g $1,7 \times 10^{-3}$ mol	50 ml $5,0 \times 10^{-3}$	150 ml $1,5 \times 10^{-2}$	Wasser	ü. Nacht 25°C	100,0%

[0066] Die in dieser Tabelle zusammengefaßten Protokolle werden nachfolgend für die Oxidation (6), HES 10 kD, im Detail wiedergegeben: 6.4 g HES 10 kD (1.7 mmol) wurden in einem Reaktionsgefäß unter ständigem Rühren in wenigen ml Wasser gelöst. Dazu wurden 50 ml einer 0.1 N Jodlösung (5.0 mmol) und 150 ml einer 0.1 N KOH-Lösung (15 mmol) gegeben. Diese Mischung wurde über Nacht bei 25°C stehen gelassen. Der Mix wurde mit Amberlite IR 120 (Na<sup>+</sup>-Form) gereinigt und gegen Wasser dialysiert (Dialyseschlauch Celluloseacetat; Cutoff 4 bis 6 kD). Das dialysierte Produkt wurde lyophilisiert (Heraeus-Christ Alpha, Kolbentrocknung über Nacht).

[0067] Wie Tabelle 1 zu entnehmen ist, wurde eine vollständige Oxidation der reduzierenden Endgruppen (entspricht Ertrag 100%) der HES 130 kD erzielt, nachdem die Iod-Menge von  $3,0 \times 10^{-5}$  mol bis auf  $1,0 \times 10^{-3}$  ml erhöht wurde.

[0068] Für eine vollständige Oxidation der reduzierenden Endgruppen der HES 10 kD war eine weitere Steigerung der Iod-Menge auf eine Konzentration von mehr als  $2,1 \times 10^{-3}$  notwendig.

## Beispiel 2

Bindung von HES mit oxidierten reduzierenden Endgruppen an HSA in wässriger Phase

[0069] Für die Kopplung wurde Hydroxyethylstärke mit oxidierten reduzierenden Endgruppen (ox-HES) und HSA vollständig in Wasser gelöst. Als die Lösung klar war, wurde EDC in Wasser gelöst zugegeben. Nach Aktivierung durch EDC bei gemäßigttem Rühren wurden weitere Mengen an EDC zugegeben. Die Reaktion wurde gegebenenfalls mit HOBt aktiviert und über Nacht stehengelassen. Das Produkt wurde durch Dialyse gegen destilliertes Wasser für 15 Stunden gereinigt und anschließend lyophilisiert (nachfolgend als Verfahren A bezeichnet).

[0070] Die Protokolle der Kopplungsreaktion finden sich in Tabelle 2.

# DE 101 12 825 A 1

Tabelle 2

Kopplungsreaktionen zwischen HES (130 kD und 10 kD) mit oxidierten reduzierenden Endgruppen und HSA unter verschiedenen Bedingungen (Verfahren A; Zahl in der Klammer in Spalte HES gibt das Oxidationsverfahren nach Tabelle 1 wieder)

5

Verfahren A	HSA	ox-HES (Mn)	EDC	HOBt	Lösungsmittel	Aktivier.	Reaktion
10 Kopplung I ox-HES 130	300 mg $4.4 \times 10^{-6}$ mol	100 mg (1) $2.4 \times 10^{-6}$ mol	25 mg $1.6 \times 10^{-4}$ mol	100 mg $7.7 \times 10^{-4}$ mol	H <sub>2</sub> O/Dioxan 13 ml/2 ml	1.5 h 3-4°C	4 h 25°C
15 Kopplung II ox-HES 130	100 mg $1.5 \times 10^{-6}$ mol	300 mg (2) $7.0 \times 10^{-6}$ mol	15 mg $9.7 \times 10^{-5}$ mol	100 mg $7.7 \times 10^{-4}$ mol	H <sub>2</sub> O/Dioxan 10 ml/3 ml	1.5 h 3-4°C	ü. Nacht 25°C
20 Kopplung III ox-HES 130	200 mg $3.0 \times 10^{-6}$ mol	3.8 g (5) $8.9 \times 10^{-5}$ mol	46.5 mg $3.0 \times 10^{-3}$ mol	20 mg $1.5 \times 10^{-4}$ mol	H <sub>2</sub> O/Dioxan 10 ml/3 ml	0 h	24 h 25°C
25 Kopplung IV ox-HES 130	100 mg $1.5 \times 10^{-6}$ mol	1.9 g (5) $4.5 \times 10^{-5}$ mol	25 mg $1.6 \times 10^{-4}$ mol	20 mg $1.5 \times 10^{-4}$ mol	Wasser	1.5 h 3-4°C	ü. Nacht 25°C
30 Kopplung V ox-HES 130	200 mg $3.0 \times 10^{-6}$ mol	4.3 g (5) $1.0 \times 10^{-4}$ mol	100 mg $6.0 \times 10^{-4}$ mol	0 mg	Wasser	0 h	ü. Nacht 25°C
35 Kopplung VI ox-HES 130	100 mg $1.5 \times 10^{-6}$ mol	130 mg (7) $3.0 \times 10^{-6}$ mol	50 mg $3.0 \times 10^{-4}$ mol	0 mg	Wasser* 5ml + 10ml	0 h	5 h 25°C
40 Kopplung VII ox-HES 10	100 mg $1.5 \times 10^{-6}$ mol	130 mg (7) $3.0 \times 10^{-6}$ mol	200 mg $3.0 \times 10^{-4}$ mol	0 mg	Wasser* 5ml + 2x 10ml	0 h	24 h 25°C
45 Kopplung I ox-HES 10	100 mg $1.5 \times 10^{-6}$ mol	300 mg (1) $8.1 \times 10^{-6}$ mol	5 mg $3.0 \times 10^{-5}$ mol	100 mg $7.7 \times 10^{-4}$ mol	H <sub>2</sub> O/Dioxan 13 ml/2 ml	1.5 h 3-4°C	ü. Nacht 25°C
50 Kopplung II ox-HES 10	70 mg $1.0 \times 10^{-6}$ mol	1.0 g (2) $2.7 \times 10^{-6}$ mol	15.5 mg $1.0 \times 10^{-4}$ mol	0 mg	Wasser	10 ml 0 h	ü. Nacht 25°C
55 Kopplung III ox-HES 10	200 mg $3.0 \times 10^{-6}$ mol	3.0 g (3) $8.1 \times 10^{-6}$ mol	77.5 mg $5.0 \times 10^{-4}$ mol	20 mg $1.5 \times 10^{-4}$ mol	Wasser	0 h	6 h 25°C
60 Kopplung IV ox-HES 10	50 mg $7.4 \times 10^{-7}$ mol	7.4 g (4) $2.0 \times 10^{-5}$ mol	282 mg $1.5 \times 10^{-3}$ mol	0 mg	Wasser	0 h	ü. Nacht 25°C
65 Kopplung V ox-HES 10	100 mg $1.5 \times 10^{-6}$ mol	103 g (6) $2.8 \times 10^{-5}$ mol	93 mg $5.6 \times 10^{-4}$ mol	0 mg	Wasser* 4 ml	0 h	20 h 25°C
70 Kopplung VI ox-HES 10	100 mg $1.5 \times 10^{-6}$ mol	103 g (6) $2.8 \times 10^{-5}$ mol	200 mg $1.2 \times 10^{-3}$ mol	0 mg	Wasser* 3x5 ml	0 h	30 h 25 °C

\* = Zugabe der EDC-Lösung mit einem Tropftrichter innerhalb von 60 Min.

45

[0071] Die Kopplungsreaktion VII zwischen ox-HES 130 kD und HSA wird im folgenden im Detail erläutert: In einem Rundkolben wurden 130 mg ox-HES 130 kD (Oxidationsgrad ca. 100%) und 100 mg HSA unter Rühren in ca. 5 ml Wasser bei Raumtemperatur gelöst. Sobald die Lösung klar war, wurden 200 mg EDC in 3 Portionen jeweils in 5-10 ml Wasser gelöst über einen Zeitraum von einer Stunde zugetropft. Zwischen jeder Zugabe ließ man ca. 4 h bei Raumtemperatur rühren. Nach 24 h Reaktionszeit wurde das Gemisch gegen Wasser dialysiert (Dialyseschlauch Celluloseacetat; Cutoff 4-6 kD). Anschließend wurde das Produkt lyophilisiert.

50

### Beispiel 3

55

#### Direkte Bindung von HES an HSA in wässriger Phase

[0072] Das Prinzip dieser Reaktion basiert auf der Bildung von Schiffchen Basen zwischen HES und Aminogruppen des Proteins, wobei die Reaktion durch die Reaktion der Schiffchen Base zu dem entsprechenden Amin mittels NaBH<sub>4</sub> gesteuert wird (nachfolgend als Verfahren B bezeichnet).

60

[0073] Dafür wurde HES vollständig in wenig Wasser gelöst. Dazu wurde in Boratpuffer, pH 9.0, gelöstes HSA gegeben. Zu dieser Lösung wurde NaBH<sub>4</sub> gegeben und bei Raumtemperatur unter Rühren belassen. Ein weiteres Aliquot von HES 130 kD, gefolgt von weiterem NaBH<sub>4</sub> wurden zugegeben. Nach Abschluß der Reaktion wurde wie beschrieben dialysiert und gefriergetrocknet.

[0074] Die Protokolle der einzelnen Versuche sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

65



Tabelle 3

Direkte Kopplungs zwischen HES (130 kD und 10 kD) und HSA unter verschiedenen Bedingungen (Verfahren B)

Verfahren B	HSA	HES (Mn)	NaBH <sub>4</sub>	Puffer pH	Reaktionszeit
Kopplung I HES 130	50 mg $7.5 \times 10^{-7}$ mol	500 mg $1.2 \times 10^{-5}$ mol	500 mg $1.3 \times 10^{-2}$ mol	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0 ml 7,4	48 h 25 °C
Kopplung II HES 130	100 mg $1.5 \times 10^{-6}$ mol	1.0 g $2.4 \times 10^{-5}$ mol	60 mg $1.6 \times 10^{-3}$ mol	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1 ml 7,4	20 h 25 °C
Kopplung III HES 130	50 mg $7.5 \times 10^{-7}$ mol	9.8 g $2.3 \times 10^{-4}$ mol	285 mg $7.5 \times 10^{-3}$ mol	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1 ml 7,4	36 h 25 °C
Kopplung IV HES 130	50 mg $7.5 \times 10^{-7}$ mol	2.0 g $4.7 \times 10^{-5}$ mol	180 mg $4.7 \times 10^{-3}$ mol	Borat 0.1M 9.0	30 h 25 °C
Kopplung V HES 130	50 mg $7.5 \times 10^{-7}$ mol	4.0 g $9.4 \times 10^{-5}$ mol	60 mg $1.6 \times 10^{-3}$ mol	Borat 0.1M 9.0	100 h 25 °C
Kopplung I HES 10	50 mg $7.5 \times 10^{-7}$ mol	2.8 g $9.4 \times 10^{-5}$ mol	28 mg $1.6 \times 10^{-3}$ mol	Borat 0.1M 9.0	80 h 25 °C

[0075] Im einzelnen wurde für die Kopplung der HES 130 kD 2.0 g dieser Verbindung vollständig in Wasser gelöst (ca. 5 ml). Dazu wurde 50 mg in 1 ml 0.1 M Boratpuffer, pH 9,0, gelöstes HSA gegeben. Zu dieser Lösung wurden 30 mg NaBH<sub>4</sub> gegeben und unter Rühren bei Raumtemperatur belassen. Nach 18 h wurde ein weiteres Aliquot von 2.0 g HES 130 kD, gefolgt von weiteren 30 mg NaBH<sub>4</sub> zugegeben. Nach insgesamt 100 h Reaktionszeit wurde dialysiert und gefriergetrocknet (Kopplung V, HES 130 kD).

[0076] Für die Kopplung der HES 10 kD wurden 1.4 g dieser Verbindung komplett in Wasser gelöst (ca. 5 ml). Dazu wurde 50 mg in 1 ml 0,1 M Boratpuffer, pH 9,0, gelöstes HSA gegeben. Zu dieser Lösung wurden 14 mg NaBH<sub>4</sub> gegeben und unter Rühren bei Raumtemperatur belassen. Nach 18 h wurde ein weiteres Aliquot von 1.4 g HES 10 kD, gefolgt von weiteren 14 mg NaBH<sub>4</sub> zugegeben. Nach insgesamt 80 h Reaktionszeit wurde dialysiert und gefriergetrocknet (Kopplung I, HES 10 kD).

## Beispiel 4

## Analyse der Kopplungsprodukte mittels GPC

[0077] Die Reaktionsprodukte wurden zunächst unter Verwendung von Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) analysiert.

4.1 Für die GPC wurde ein FPLC-Gerät (Pharmacia), welches mit einem HPLC UV Monitor (Hitachi) verbunden war, verwendet. Ferner wurden die folgenden Bedingungen verwendet:

Säule: Superose 12 HR 10/30 (1 × 30 cm) (Pharmacia)

UV-Monitor: 280 nm

Pumpe: 0,2 ml/min

Puffer: 50 mM Phosphat/150 mM NaCl pH 7,2.

Unter diesen Bedingungen wird der HSA-Peak üblicherweise nach 63 min gefunden, wobei zusätzlich ein kleiner Peak bei etwa 57 min gemessen werden kann, der durch HSA-Dimere verursacht wird. Die mittels GPC erhaltenen Chromatogramme lassen sich wie folgt analysieren:

4.2 Fig. 1 ist ein Chromatogramm, das die Größenverteilung der Produkte nach Kopplung von ox-HES 130 kD an HSA (Kopplung III) zeigt. Bei diesem Kopplungsverfahren wurden ohne HOBt-Aktivierung sehr gute Ergebnisse erzielt. Ein deutlicher, einzelner breiter Peak wurde bei 37 Min. und eine weitere, kleinere Bande bei 45 Min. gemessen, was auf ein Kopplungsprodukt mit höherem Molekulargewicht als HSA hinweist. Gleichzeitig wurden Spuren von nicht-modifiziertem HSA gefunden.

Fig. 2 zeigt die Größenverteilung der Produkte nach Kopplung von ox-HES 130 kD an HSA (Kopplung IV). Die Reaktion wurde mit HOBt aktiviert. Es zeigt sich, dass diese Aktivierung die Ausbeute verringert, möglicherweise durch Förderung von Nebenreaktionen.

Die Fig. 3 und 4 zeigen die Größenverteilung der Reaktionsprodukte während und nach der Kopplungsreaktion von ox-HES 130 kD an HSA (Kopplung V). Nach 2 Stunden Reaktionszeit wurde nicht-modifiziertes HSA als Produkt mit der höchsten Konzentration, daneben aber auch erste Kopplungsprodukte mit höherem Molekulargewicht gefunden. Nach Ablauf der Reaktion wurde ein homogenes Kopplungsprodukt mit einer Retentionszeit von ca. 35 Min. in hoher Konzentration gefunden. Nichtmodifiziertes HSA und andere Kopplungsprodukte lagen in relativ geringer Konzentration vor.

Fig. 5 zeigt die entsprechende Größenverteilung der Reaktionsprodukte während und nach der Kopplungsreaktion von ox-HES 10 kD an HSA (Kopplung V). Auch hier zeigt sich, dass die Konzentration der Kopplungsprodukte mit einem Molekulargewicht, das oberhalb des Gewichtes von HSA liegt, im Verlauf der Reaktion zunimmt.

Eine Kopplungsreaktion, bei der nahezu alle HSA-Moleküle in ein homogenes Kopplungsprodukt überführt werden konnten, wird schließlich in Fig. 6 gezeigt (Reaktionsprodukte der Kopplung VII).

4.3 Ein Beispiel für die Chromatogramme, die bei der Analyse der direkten Kopplung von HES an HSA erhalten wurden, wird in Fig. 7 gezeigt (Verfahren B, HES 130 kD, Kopplung V). Ein deutlicher Peak bei ca. 65 Min. (HSA) ist zu erkennen. Darüber hinaus wurde aber auch ein Kopplungsprodukt nachgewiesen (Peak bei ca. 42 Min.).

5

## Beispiel 5

## Analyse der Kopplungsprodukte mittels SDS-PAGE und Western Blot

10 5.1 5.1 PAGE wurde in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) unter Verwendung eines MiniProtean II Gerätes der Firma Biorad und 7,5% Acrylamidgele durchgeführt. Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte nach den Vorschriften des Herstellers. Die Gele wurden nach dem Verfahren von Blum (Elektrophorese, Vol. 8, (1997) S. 93-99) mit Silber gefärbt, um Proteine sichtbar zu machen.

15 Die Gegenwart von Glykanen in den Kopplungsprodukten wurde mittels Western-Blot und Glykan-Detektions-Kit der Firma Roche-Boehringer nachgewiesen. Nach Auftrennung der Produkte mittels SDS-PAGE wurden diese unter Verwendung des Blotting-Gerätes der MiniProtean II Elektrophoreseeinheit auf eine Nitrocellulosemembran überführt. Die Membran wurde anschließend mittels Periodat unter Bedingungen oxidiert, bei denen lediglich die vicinalen OH-Gruppe oxidiert werden. Diese wurden anschließend mit einem Amino-funktionalisierten Digoxigenin umgesetzt. Gebundenes Digoxigenin wurde mittels spezifischer monoklonaler Antikörper, welche an eine alkaline Phosphatase gebunden waren, nachgewiesen. Dafür wurde ein Substrat der Phosphatase (4-Nitro-tetrazoliumchlorid/5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat) zugegeben, welches ein schwerlösliches blau-violettes Produkt erzeugt. Dieses Produkt schlägt sich auf der Membran nieder und lässt somit die Banden sichtbar werden. Nichtmodifiziertes HSA und Kreatinase wurden als Negativkontrollen eingesetzt, während Transferrin als Positivkontrolle fungierte.

25 Die genauen Verfahrensschritte sind im Beipackzettel zu diesem Kit beschrieben (Roche-Boehringer).

5.2 Die Fig. 8 und 9 zeigen jeweils eine Aufnahme des Silbergefärbten SDS-PAGE-Gels (oben) und die Aufnahme der entsprechenden Produkte nach Übertragung auf eine Membran und Glykannachweis (unten). Wie sich aus diesen Figuren entnehmen lässt, entsteht während der Kopplungsreaktion ein relativ homogenes Glykan als Reaktionsprodukt, während gleichzeitig die Konzentration an nicht-modifiziertem HSA abnimmt.

30

## Beispiel 6

## Abklärung möglicher Nebenreaktionen

35 [0078] Zur Klärung, ob Nebenreaktionen in Form einer Selbstkondensation von HES mit oxidierten reduzierenden Endgruppen erfolgen, wurden folgende Reaktionsansätze erstellt:

Tabelle 4

Reaktionsansätze zur Abklärung von Nebenreaktionen

40

	ox-HES	EDC	HOBt	Wasser	Reaktionszeit
45 HES 130 kD	500 mg $1.2 \times 10^{-5}$ mol	15 mg $7.8 \times 10^{-5}$ mol	-	5.0 ml	30 h 25 °C
HES 130 kD	500 mg $1.2 \times 10^{-5}$ mol	15 mg $7.8 \times 10^{-5}$ mol	gesättigte Lösung	5.0 ml	30 h 25 °C
50 HES 10 kD	100 mg $2.7 \times 10^{-5}$ mol	3.4 mg $1.8 \times 10^{-5}$ mol	-	5.0 ml	30 h 25 °C
HES 10 kD	100 mg $2.7 \times 10^{-5}$ mol	3.4 mg $1.8 \times 10^{-5}$ mol	gesättigte Lösung	5.0 ml	30 h 25 °C
55 HES 130 kD	700 mg $1.6 \times 10^{-5}$ mol	31 mg $1.6 \times 10^{-4}$ mol	-	5.0 ml	30 h 25 °C
HES 130 kD	700 mg $1.6 \times 10^{-5}$ mol	31 mg $1.6 \times 10^{-4}$ mol	gesättigte Lösung	5.0 ml	30 h 25 °C

60 [0079] Ziel der Experimente war nachzuweisen, inwieweit eine mögliche Selbstkondensation von HES in Gegenwart oder Abwesenheit von HOBt stattfindet. Die Proben wurden lyophilisiert und zur Durchführung der Analytik an Fresenius-Kabi übergeben.

[0080] Mittels GPC und Streulichtmessungen konnten innerhalb der Detektionsgrenzen von einigen Prozent keine Hinweise auf Molekulargewichtsvergrößerungen gefunden werden.

65

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines kovalenten HES-Wirkstoff-Konjugates, bei dem man HES und einen Wirkstoff in einem Reaktionsmedium miteinander umsetzt, dadurch gekennzeichnet, dass das Reaktionsmedium Wasser

# DE 101 12 825 A 1

- oder ein Gemisch von Wasser mit organischem Lösungsmittel, welches mindestens 10 Gew.-% Wasser umfaßt, ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem der Wirkstoff ein Vitamin, Impfstoff, Toxin, Antibiotikum, Appetitzügler, Anästhetikum, Analgetikum, Antirheumatikum, Antiallergikum, Antiasthmatikum, Antidepressivum, Antidiabetikum, Antihistaminikum, Antihypertonikum, oder ein antineoplastisches Mittel ist.
  3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem der Wirkstoff ein Hormon, Steroid, Lipid, Protein, Oligo- oder Polypeptid oder eine Nukleinsäure ist. 5
  4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei dem der Wirkstoff ein Enzym, Enzym-Inhibitor, Rezeptor, Rezeptor-Fragment, Insulin, Faktor VIII, Faktor IX, Zytokin, Interferon, Interleukin, Wachstumsfaktor, Peptid-Antibiotikum, virales Hüll-Protein, Hämoglobin, Erythropoietin, Albumin, hTPA, Antikörper, Antikörperfragment, Einzelketten-Antikörper, DNA, RNA oder ein Derivat davon ist. 10
  5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, bei dem der Wirkstoff ein Steroidhormon, ein von Aminosäuren abgeleitetes Hormon oder ein von Fettsäuren abgeleitetes Hormon ist.
  6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, bei dem man HES an die  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-Gruppe, an die  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-Gruppe, an die SH-Gruppe an eine COOH-Gruppe oder an eine -C(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-Gruppe des Wirkstoffes bindet.
  7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, bei dem man HES vor Bindung an den Wirkstoff oxidiert. 15
  8. Verfahren nach Anspruch 7, bei dem man die reduzierende Endgruppe der HES selektiv oxidiert.
  9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, bei dem die oxidierte reduzierende Endgruppe HES mit einer Aminogruppe des Wirkstoffes unter Ausbildung eines Amides reagiert.
  10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, bei dem man eine Aminogruppe des Wirkstoffes mit HES so umsetzt, dass eine Schiff'sche Base gebildet wird. 20
  11. Verfahren nach Anspruch 10, bei dem die Azomethingruppe -CH=N- der Schiff'schen Base zu einer Methylennamingruppe -CH<sub>2</sub>-NH- reduziert wird.
  12. Verfahren nach Anspruch 9 oder 11, bei dem als Reduktionsmittel BH<sub>4</sub><sup>-</sup> verwendet wird.
  13. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem man den Wirkstoff oder HES vor der Herstellung des Konjugates an einen Linker bindet. 25
  14. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem man Hydroxyethylstärke mit einem mittleren Molekulargewicht (Gewichtsmittel) von 1 bis 300 kDa verwendet.
  15. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem man Hydroxyethylstärke mit einem mittleren Molekulargewicht von 2 bis 40 kDa verwendet.
  16. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem man Hydroxyethylstärke mit einem molaren Substitutionsgrad von 0,1 bis 0,8 und ein Verhältnis von C<sub>2</sub> : C<sub>6</sub>-Substitution im Bereich von 2 bis 20, jeweils bezogen auf die Hydroxyethylgruppen, verwendet. 30
  17. HES-Wirkstoff-Konjugat, erhältlich nach einem der Ansprüche 1 bis 17.
  18. Verfahren zur Herstellung eines Arznei- oder Diagnosemittels, umfassend Schritte bei denen man ein HES-Wirkstoff-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 16 herstellt und mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger, Adjuvans oder Hilfsstoff vermischt. 35
  19. Mittel, erhältlich nach Anspruch 18.

Hierzu 10 Seite(n) Zeichnungen

40

45

50

55

60

65

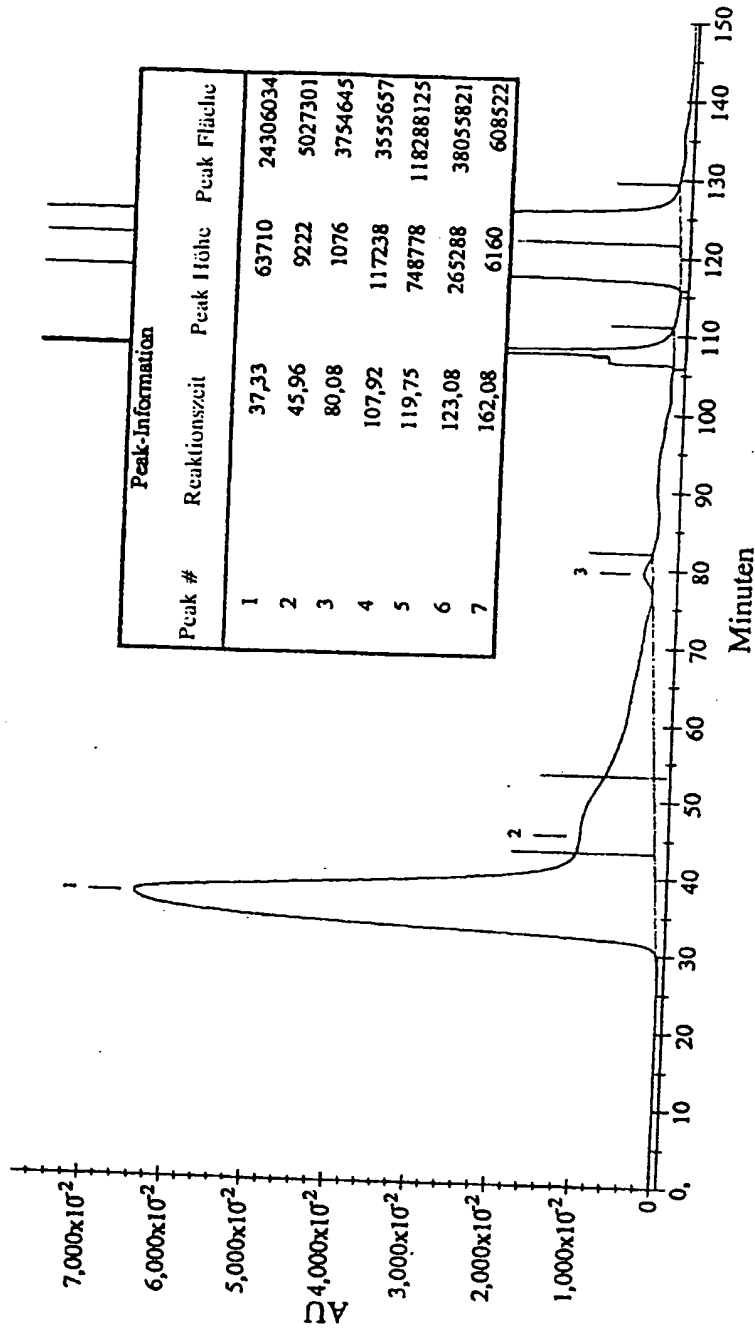


Fig. 1: GPC Chromatogramm der Kopplung III ox-HES 130 kD an HSA-

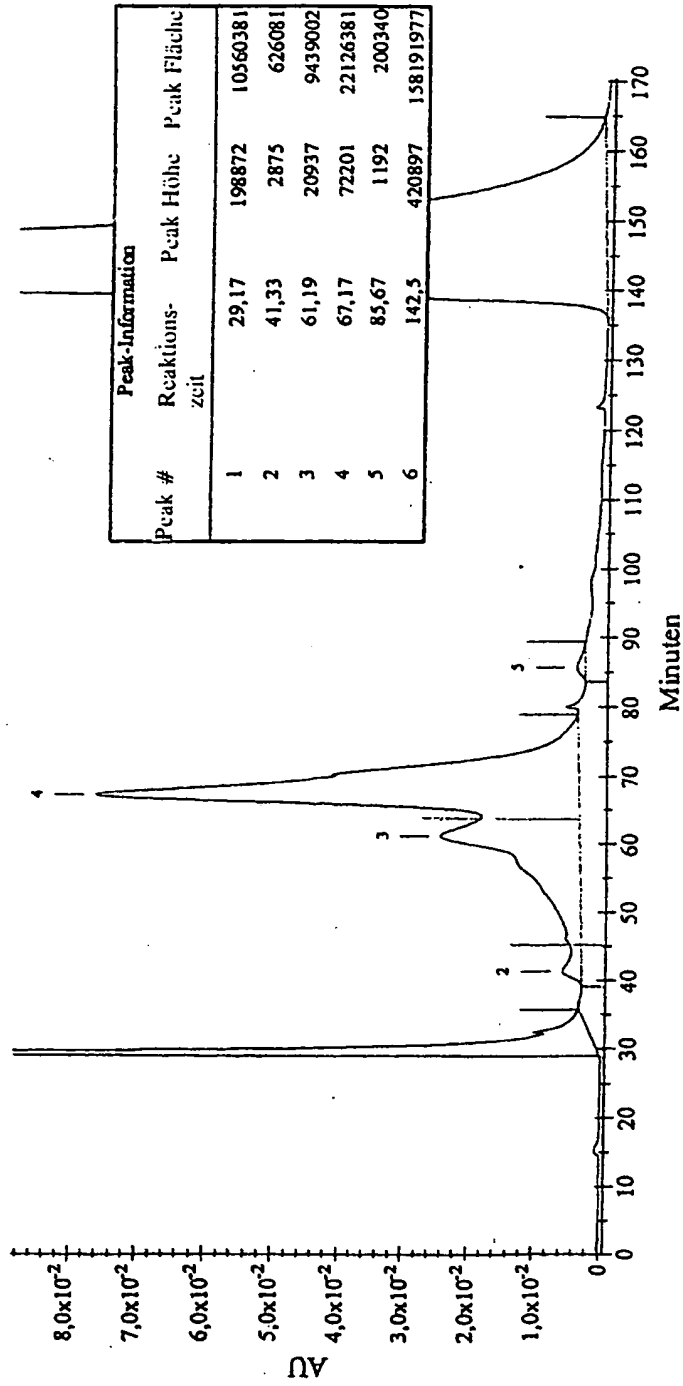


Fig. 2: GPC Chromatogramm der Kopplung IV ox-HES 130 kD an HSA

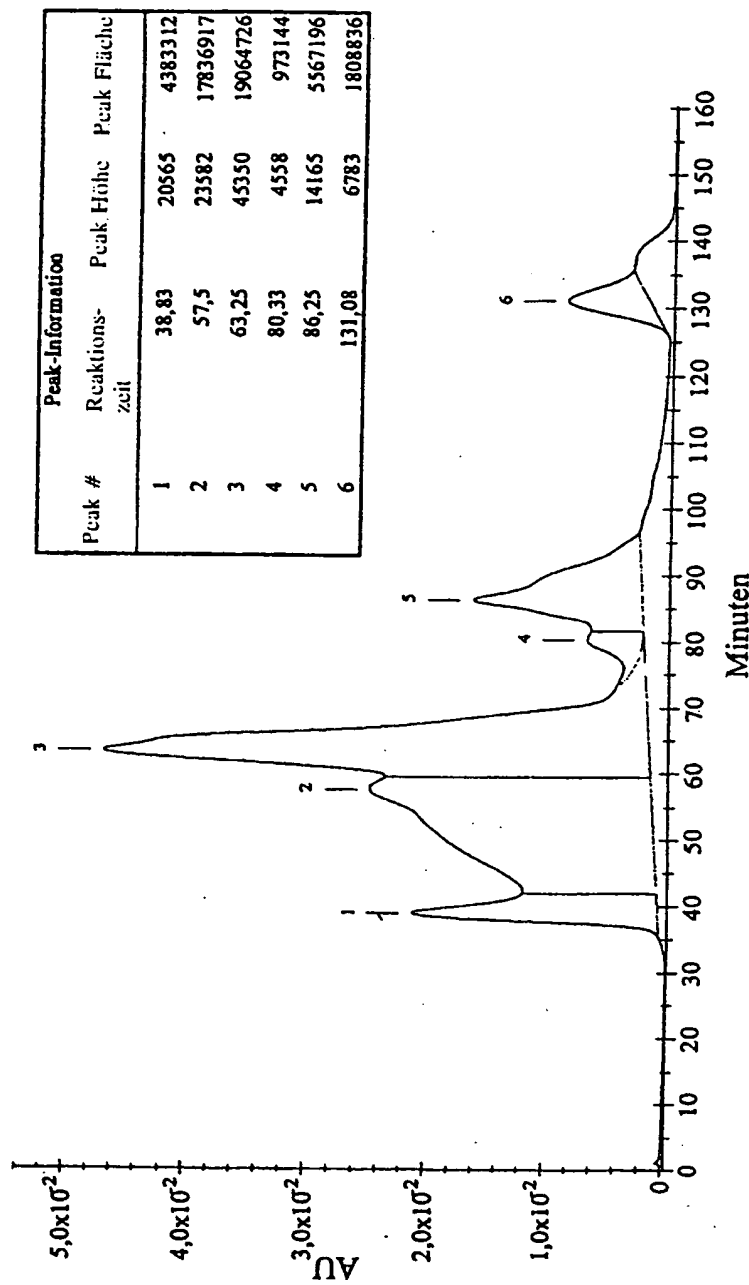


Fig. 3: GPC Chromatogramm der Kopplung V ox-HES 130 kD an HSA (Reaktionszeit 2 h)

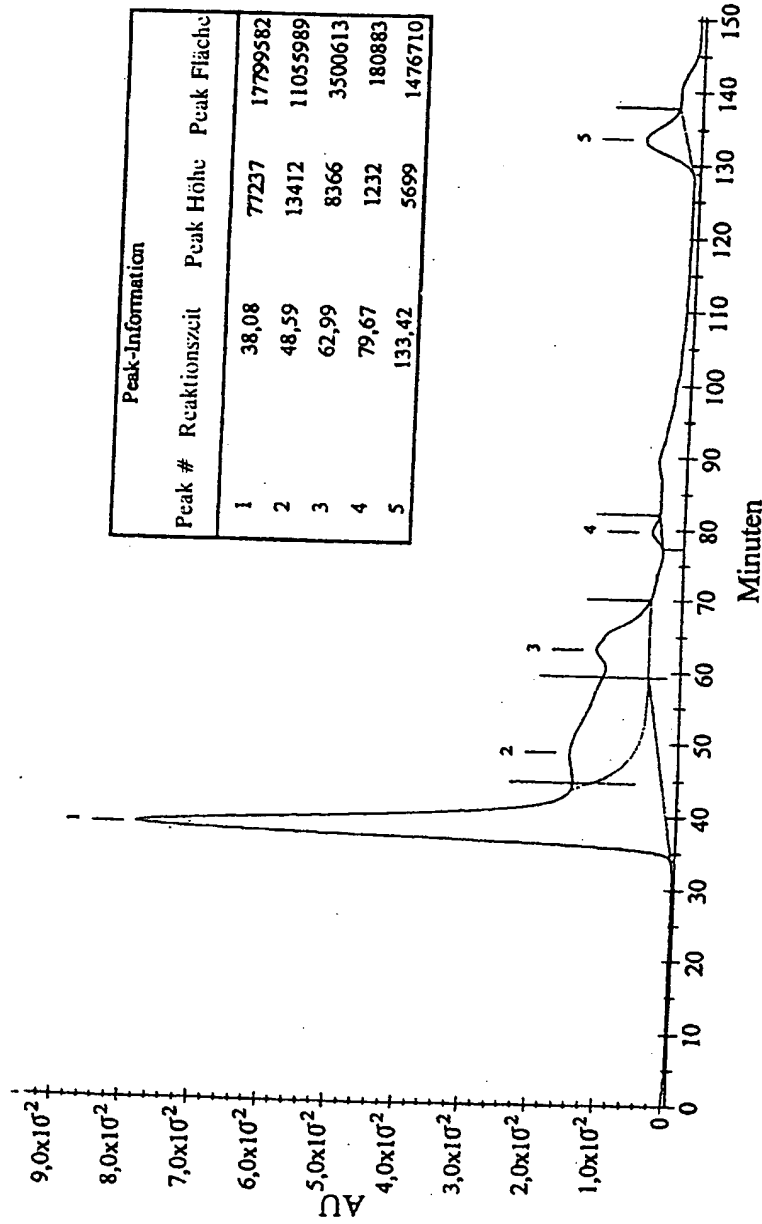


Fig. 4: GPC Chromatogramm der Kopplung V ox-HES 130 kD an HSA (nach vollständiger Reaktion)

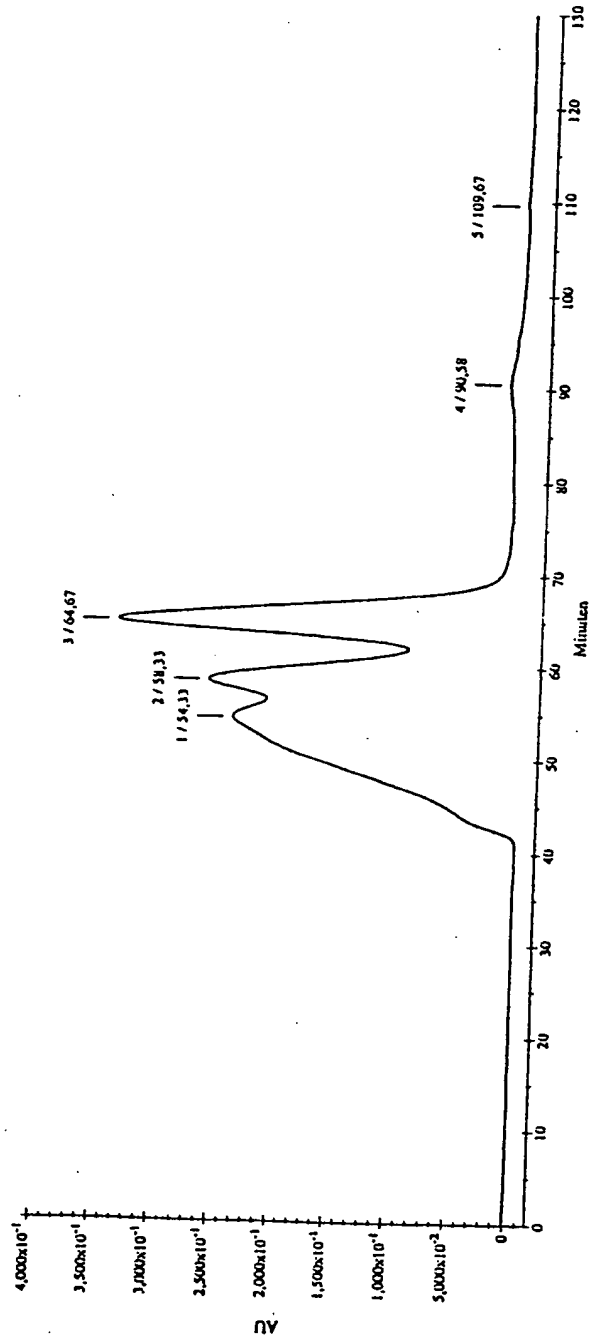


Fig. 5a: GPC-Analytik der Reaktionskinetik der V. Kopplung ox-HES 10 kD an HSA nach 2 h



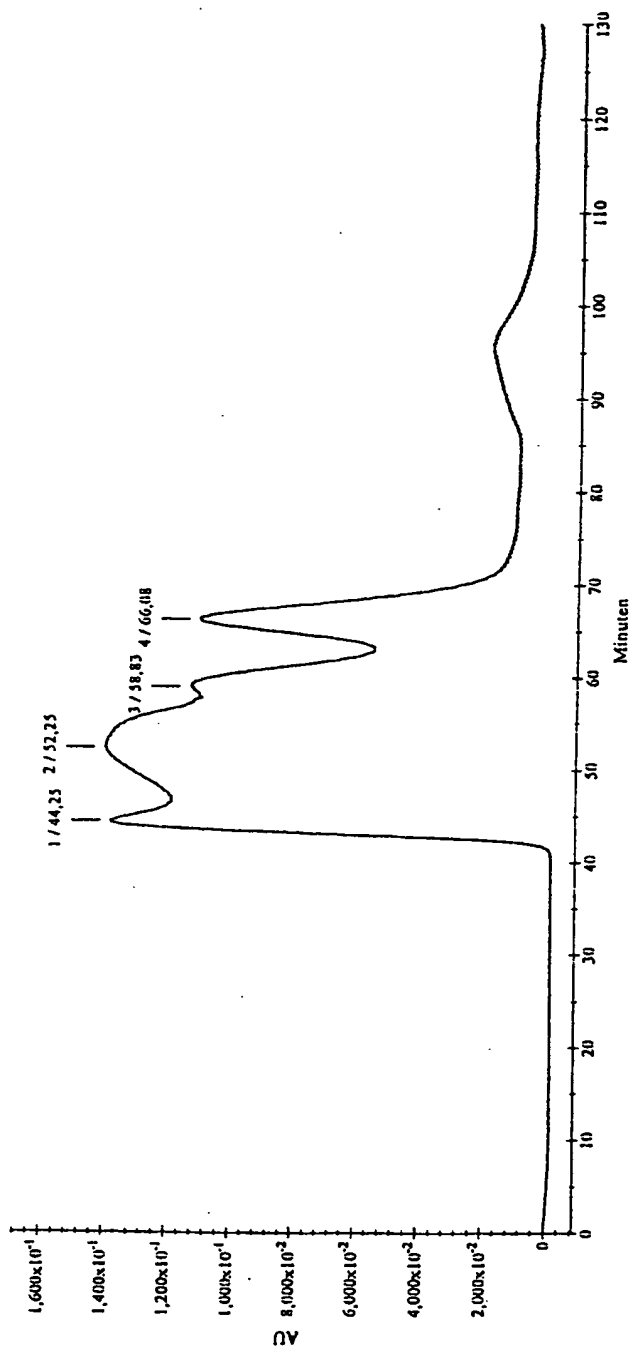


Fig. 5b: GPC-Analytik der Reaktionskinetik der V. Kopplung ox-HES 10 kD an HSA nach 16 h

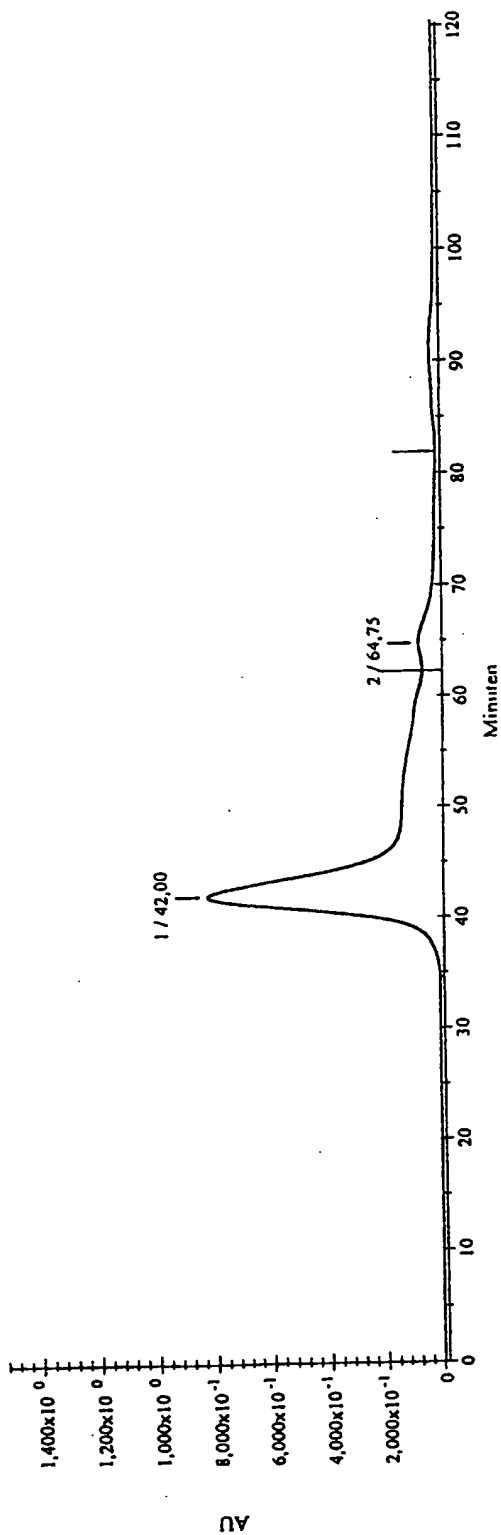


Fig. 6: GPC-Analytik des Reaktionsgemisches nach 24 h Inkubation  
der VII. Kopplung ox-HES 130 kD an HSA

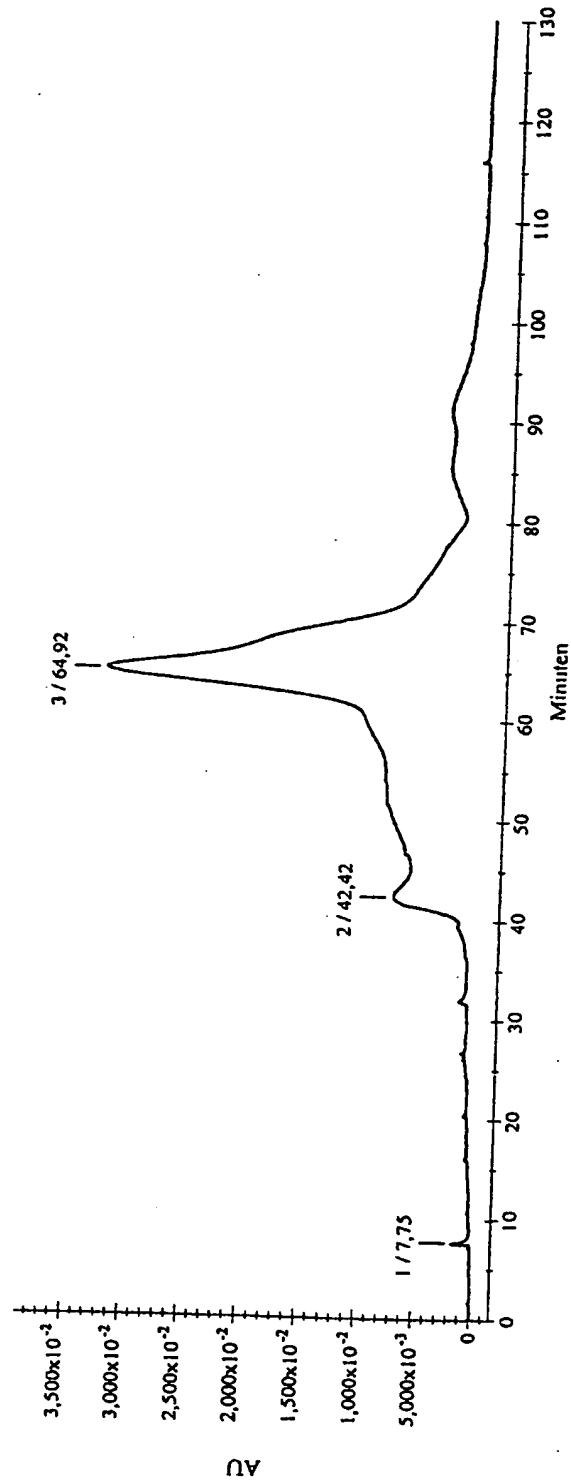


Fig. 7: GPC-Chromatogramm V. Kopplung HES 130 kD an HSA und Borhydridreduktion

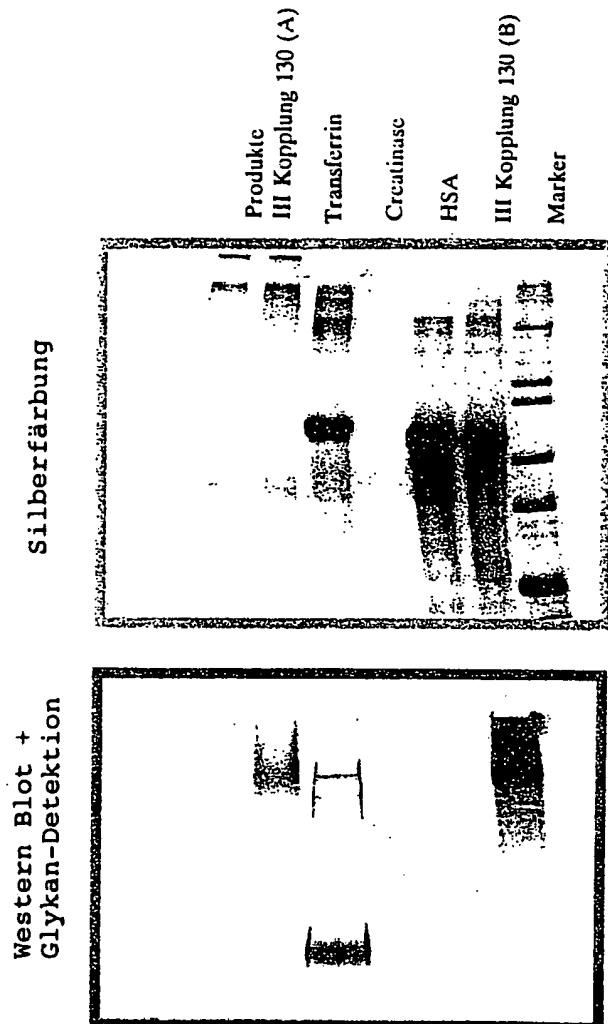


Fig. 8: Obere Aufnahme: SDS-PAGE der Kopplungsreaktionen III (Verfahren A und B) zwischen HSA und oxHES 130 kD und HES 130 kD, respektive, mit Silberfärbung (Bahn 1: Kopplung III Verfahren A); Bahn 2: Transferin; Bahn 3: Creatinase; Bahn 4: nicht-modifiziertes HSA; Bahn 5: Kopplung III (Verfahren B); Bahn 6: Marker).

Untere Aufnahme: Western Blot mit Glykan-Nachweis derselben Proben, wobei Transferin (Bahn 2) als Positiv-Kontrolle und Creatinase (Bahn 3) sowie HSA (Bahn 4) als Negativ-Kontrolle fungieren.

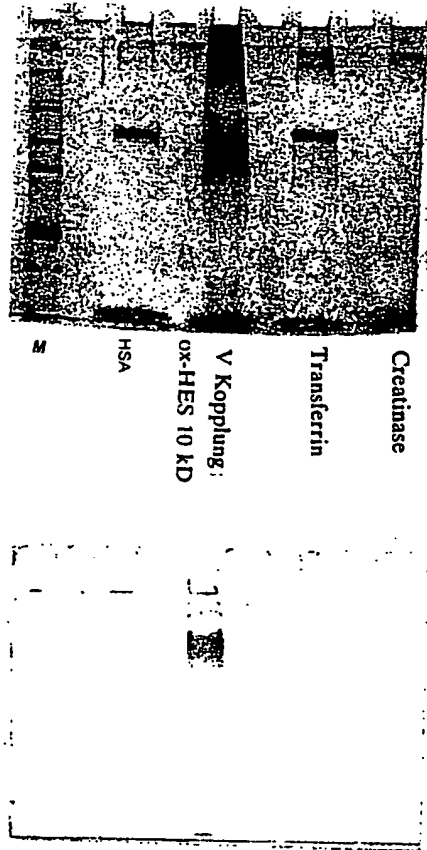


Fig. 9: SDS-PAGE, silbergefärbt, 12 % PAA (oben) und Western Blot/Glykan (unten) der Reaktionsmischung aus V. Kopplung ox-HES 10 kD mit HSA